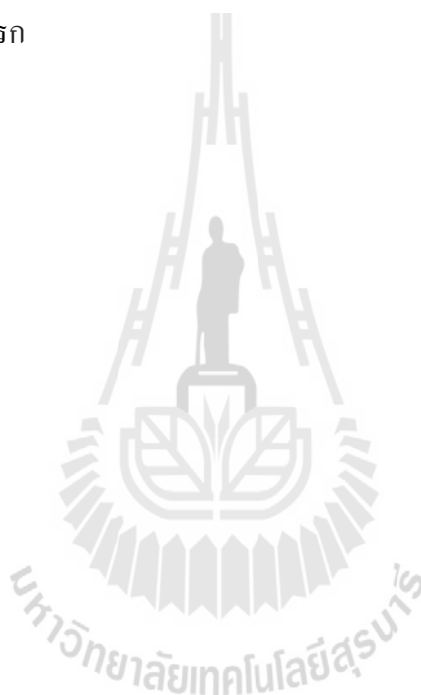


อนรรฆอร วรรณจินดาพร : การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลหวาย
พันธุ์เอียสกุลโดยโซเดียมเอไซด์ (MUTATION INDUCTION OF *Dendrobium* 'Earsakul'
USING SODIUM AZIDE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฉ้วน
ต้นตอสวัสดิ์, 112 หน้า.

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความสวยงามและหลากหลายสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพดีและมีผลผลิตสูงจึงมีความจำเป็น ซึ่งการก่อกลายพันธุ์เป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยวิธีการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) การก่อกลายพันธุ์ protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วย NaN_3 2) การคัดเลือกและตรวจสอบต้นสายพันธุ์กลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ 2.1) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2.2) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ 2.3) การคัดเลือกและตรวจสอบด้วยวิธีการระดับเซลล์ ซึ่งจากการทดสอบหาความเข้มข้นของ NaN_3 ที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล โดยใช้ reverse osmosis water (ROW; control 1) และ NaN_3 ความเข้มข้น 0 (control 2), 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 mM และบันทึกเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3 วัน 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของ PLBs เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ NaN_3 ที่สูงขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการก่อกลายพันธุ์ PLBs (LD_{30} และ LD_{50}) ด้วย NaN_3 คือ 0.1 และ 0.5 mM จากการก่อกลายพันธุ์ PLBs ด้วย NaN_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM และการไม่ก่อกลายพันธุ์ (ROW (control 1) และ 0 mM NaN_3 (control 2)) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 6 เดือน แล้วนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่าต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์บางต้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงคือ ลำต้นเดี่ยว ขั้วปล้องสั้นและถี่ ใบสั้น ใบหนา รากสั้น และรากมีจำนวนน้อย แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลง เมื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM จำนวน 24 ต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์จำนวน 10 ต้น โดยใช้เครื่องหมาย inter-simple sequence repeats (ISSR) พบว่าได้ต้นสายพันธุ์กลายที่มีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 20 ต้น คิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ ISSR ที่ให้ความหลากหลายทั้ง 10 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 63 แถบ จาก 181 แถบ คิดเป็น 34.81 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทาง

พันธกรรมของด้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสกุลที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และด้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าเครื่องหมายทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน ($r=0.19$) และเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากมีความสามารถในการจำแนกด้นสายพันธุ์กลายสูงกว่า จากการนับจำนวนโครโมโซมบริเวณปลายราก พบว่าด้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์จาก NaN_3 และด้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม $2n=2x=24$ แสดงว่า NaN_3 ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า NaN_3 สามารถก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการจำแนกด้นที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ออกจากด้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ได้ตั้งแต่ระยะแรก



ANAKKAORN WANNAJINDAPORN : MUTATION INDUCTION OF

Dendrobium 'Earsakul' USING SODIUM AZIDE. THESIS ADVISOR :

PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 112 PP.

CYTOLOGY/DENDROBIUM/ISSR/MORPHOLOGY/MUTATION/ORCHID/
SODIUM AZIDE

The orchid is one of the most important economic ornamentals in Thailand. Owing to its beauty and high diversity, there has been a lot of demand domestically and internationally. Therefore, breeding new varieties for high quality and yield is essential. Mutation breeding is an alternative for orchid improvement. The objective of this research was to perform mutation breeding of *Dendrobium* 'Earsakul' using sodium azide (NaN_3) in vitro. The experiment was divided into 2 parts: (1) chemical mutagenesis of *Dendrobium* 'Earsakul' protocorm-like bodies (PLBs) using NaN_3 and (2) selection and evaluation of mutants, which was divided into 3 experiments: 2.1) selection and evaluation with morphological characters, 2.2) selection and evaluation with molecular markers, and 2.3) selection and evaluation with cytological method. When reverse osmosis water (ROW; control 1) and various concentrations of NaN_3 (0 (control 2), 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 mM) were evaluated to determine the optimal concentrations for inducing mutation of *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs and the percentages of mortality were recorded at 3 days, 1 and 2 weeks, it was found that the percentages of mortality of PLBs increased with the increasing concentrations of NaN_3 . The 30% (LD_{30}) and 50% (LD_{50}) mortality rates were obtained with 0.1 and 0.5 mM NaN_3 , respectively. PLBs were mutagenized at the concentrations of 0.1 and 0.5 mM NaN_3 and cultured for 6 months before being transferred to a greenhouse.

The nonmutagenized PLBs were treated with ROW (control 1) and 0 mM NaN_3 (control 2). Morphological alterations have been observed in some putative mutants: dwarf, more and shorter internodes, short and thick leaves, short roots and reduced root numbers, which differed from nonmutagenized controls where no change was observed. When genetic profiles of 24 putative mutants from mutagenesis using 0.1 and 0.5 mM NaN_3 were compared to 10 nonmutagenized controls using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers, altered DNA profiles were found in 20 out of these 24 putative mutants (83.33%). Sixty-three polymorphic bands were produced from a total of 181 bands (34.81%) by 10 polymorphic ISSR primers. Genetic diversity and relatedness were evaluated among NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls by means of ISSR analysis and morphological characters. No correlation was found between ISSR and morphological markers. In addition, ISSR had higher mutant differentiation capability, indicating its higher efficiency. The counting of chromosome numbers in the root tips showed that NaN_3 mutagenized plants and nonmutagenized controls had the same chromosome number of $2n=2x=24$, suggesting that both concentrations of NaN_3 had no effect on the chromosome number. These results indicated that NaN_3 can be effectively utilized to mutagenize *Dendrobium* ‘Earsakul’ PLBs, and the ISSR marker is a powerful tool for identification of mutants at an early stage.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2015

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____